

膜型基质金属蛋白酶-1 在肝癌组织中的表达及意义

何萍, 张雁瑞, 车丽洪, 梁惠珍, 薛玲
(中山大学中山医学院病理教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】比较膜型基质金属蛋白酶-1(membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)在大肝癌(瘤体直径>3 cm)及小肝癌(单肿瘤结节且瘤体直径≤3 cm)组织中的表达差异,并探讨其在肝癌肿瘤细胞浸润、转移过程中的作用。【方法】应用半定量 RT-PCR 方法检测 MT1-MMP mRNA 在 22 例大肝癌及 12 例小肝癌组织中的表达;应用免疫组化方法检测 MT1-MMP 蛋白在 53 例大肝癌及 40 例小肝癌组织中的表达,并分析 MT1-MMP 蛋白表达水平与肝癌浸润、转移之间的关系。【结果】MT1-MMP 蛋白在大、小肝癌组织中的表达差异显著($P=0.007$),但其 mRNA 水平的差异无统计学意义($P=0.693$);MT1-MMP 蛋白表达水平与肝癌浸润及转移之间均呈正相关关系($P=0.021$; $P=0.001$)。【结论】调控 MT1-MMP 蛋白在肝癌组织中异常表达的关键环节可能是在转录后水平进行,大肝癌肿瘤细胞的侵袭能力较小肝癌强与其高表达 MT1-MMP 蛋白有关。

关键词: 膜型基质金属蛋白酶-1; 肝细胞癌; 浸润; 转移

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)06-0692-04

Expression of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase in Hepatocellular Carcinoma

HE Ping, ZHANG Yan-rui, CHE Li-hong, LIANG Hui-zhen, XUE Ling

(Department of Pathology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 The different expression pattern of membranetype-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) was detected between advanced HCC (the diameter>3 cm) and SHCC (simple tumor nodule, the diameter ≤ 3 cm). The role of MT1-MMP in tumor invasion and metastasis was discussed. 【Methods】 The expression of MT1-MMP mRNA in 22 cases of advanced HCC and 12 cases of SHCC was detected by semi-quantitative RT-PCR. The expression of MT1-MMP protein in 53 cases of advanced HCC and 40 cases of SHCC were detected by immunohistochemistry. Moreover, the relationship between MT1-MMP protein expression and hepatocellular carcinoma invasion and metastasis were analyzed. 【Results】 The expression of MT1-MMP protein in SHCC differs from that in advanced HCC remarkably ($P = 0.007$), while, the MT1-MMP mRNA expression fails to show significantly difference between SHCC and advanced HCC ($P = 0.693$). The expression of MT1-MMP protein has a positive correlation with tumor invasion and metastasis ($P = 0.021$, $P = 0.001$). 【Conclusion】 The post-transcriptional regulation probably causes abnormal expression of MT1-MMP protein in hepatocarcinoma, which results in the differences of tumor biological behaviors between advanced HCC and SHCC.

Key words: MT1-MMP; hepatocellular carcinoma; invasion; metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(6):692-694]

肿瘤细胞对细胞外基质和基底膜成分降解是肿瘤发生浸润和转移的先决条件,基质金属蛋白酶是此降解过程中重要的酶。MT1-MMP 是新近所知的膜型基质金属蛋白酶,目前认为其功能是激活明

胶酶 A(MMP2),促进 MMP2 对基底膜成分如 IV 型胶原和层粘蛋白的降解,并且 MT1-MMP 自身也可直接发挥降解细胞外基质的作用^[1]。本研究旨在从 mRNA 及蛋白水平比较 MT1-MMP 在大、小肝癌组

收稿日期:2005-04-07

基金项目:广州市科技计划基金资助项目(2004J1-C0271)

作者简介:何萍(1977-),女,江西鄱阳人,硕士,医师;薛玲,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: lxue99@pub.guangzhou.gd.cn

组织中表达的差异,分析其在肝癌肿瘤细胞浸润、转移过程中的作用及探讨影响大、小肝癌生物学行为差异的重要因素。

1 材料与方 法

1.1 标本收集与处理

筛选 1997-2003 年中山大学附属第一医院及肿瘤医院送检的肝癌手术标本共 93 例,其中男性 81 例,女性 12 例,患者年龄 19~74 岁,中位年龄 47 岁。93 例中大肝癌(瘤体直径>3 cm)53 例,小肝癌(单肿瘤结节,瘤体直径≤3 cm)40 例。标本经 1:5 的 100 mL/L 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规 HE 染色后光镜下观察,病理检查证实均为肝细胞癌。其中 12 例小肝癌标本及 22 例大肝癌标本于手术离体后在无菌条件下立即放入 RNA 保护液中,0.5 h 内置-80℃冰箱保存。

参照 Edmondson 分级标准对所有病例进行组织学分级:Ⅰ级 5 例、Ⅱ级 49 例、Ⅲ级 27 例、Ⅳ级 12 例。凡符合下列条件之一者即归为浸润阳性组:①肿瘤发生包膜侵犯;②周围有卫星结节;③门静脉有癌栓。凡淋巴结、肺、胃、脑等肝外器官发现转移灶者即归为转移阳性组。

1.2 试剂

免疫组化:MT1-MMP 兔抗人多克隆抗体(NeoMarkers 公司);SP 超敏试剂盒(迈新公司)。半定量 RT-PCR:Trizol(Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(MBI 公司);Taq 酶(Promega 公司);DNA Marker(广州华美公司);PCR 引物由上海生物工程有限公司合成,MT1-MMP 基因引物序列为:5'-CAG AGA AGG CAC ACA AAC GA-3';5'-CAC TGG TGA GAC AGG CTT GA-3',产物大小 172 bp;用 GAPDH 作为内参照,其引物序列为:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TCG TAT-3';5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3',产物大小为 320 bp。

1.3 肝癌组织中 MT1-MMP 蛋白检测

免疫组化染色采用 SP 法。MT1-MMP 一抗工作浓度为 1:60,高压修复抗原。每次实验均以已知阳性组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

MT1-MMP 免疫组化阳性反应的分级采用兼顾阳性细胞染色强度和阳性细胞所占百分比的判断标准,即每张切片随机选取 5 个高倍视野,按阳

性细胞所占百分比评分:阴性为 0,阳性细胞数小于或等于 10%为 1,大于 10%且小于或等于 50%为 2,大于 50%且小于或等于 75%为 3,大于 75%为 4;按染色强度评分:不着色为 0,淡黄色为 1,棕黄色为 2,棕褐色为 3。阳性细胞数评分乘以染色强度评分为乘积分数,将乘积分数分为 4 个等级:-(0, 1, 2);+(3, 4);++(6, 8);+++ (9, 12)。

1.4 肝癌组织中 MT1-MMP mRNA 检测

将 34 例肝癌手术标本(12 例小肝癌,22 例大肝癌)分别取 50 mg 组织加入 1 mL Trizol,按试剂说明书提取组织总 RNA 后测定浓度及纯度。每例标本取总 RNA 5 μg 逆转录合成 cDNA。取 2 μL cDNA 加入双引物同管扩增,总反应体系为 50 μL。PCR 反应条件如下:94℃预变性 5 min;94℃50 s、57℃1 min、72℃1 min 进行 30 个循环;72℃延伸 10 min。产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后染色、摄片,用德国 IBAS 2.0 全自动图象分析系统进行灰度扫描,将 MT1-MMP 与 GAPDH 电泳条带的平均光密度和面积乘积的相对比值作为 MT1-MMP mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS11.0 统计软件处理。两组样本间均数比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料的比较采用 χ^2 检验;变量之间采用 Spearman 等级相关分析研究其相关性。 $P < 0.05$ 即认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 MT1-MMP 在肝癌中的表达

MT1-MMP 免疫组化阳性定位于肿瘤细胞和瘤旁肝细胞的胞膜及胞浆(图 1)。对 MT1-MMP 蛋

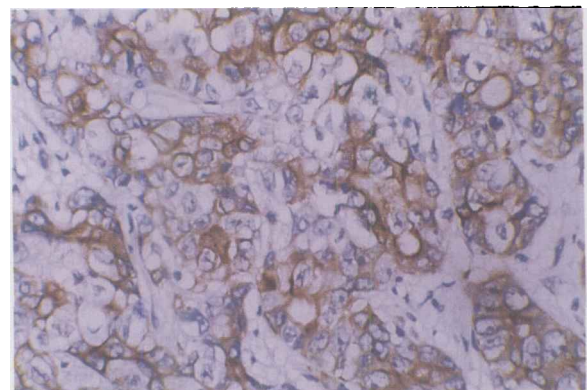


图 1 MT1-MMP 蛋白在肝癌组织中的表达

Fig.1 Expression of MT1-MMP protein in HCC

Positive staining was located in the membrane and cytoplasm of tumor cell

白在大、小肝癌组织中的表达水平进行 χ^2 检验,二者差异具有统计学意义(表 1)。

表 1 MT1-MMP 蛋白在大、小肝癌组织中的表达

HCC	n	MT1-MMP protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Small	40	23(58)	14(35)	2(5)	1(2)	12.105	0.007
Advanced	53	18(34)	16(30)	10(19)	9(17)		

半定量 RT-PCR 实验结果显示,22 例大肝癌及 12 例小肝癌组织均可见 MT1-MMP mRNA 的表达(图 2)。对 MT1-MMP mRNA 在大、小肝癌组织中的表达水平进行独立样本 *t* 检验,结果表明二者差异无统计学意义($t=-0.407$, $P=0.693$)。



图 2 MT1-MMP mRNA 在肝癌组织中的表达

Fig.2 Expression of MT1-MMP mRNA in HCC

M: marker; Lane 1-8: SHCC; Lane 9-14: advanced HCC
GAPDN: 320 bp; MT1-MMP: 172 bp

2.2 MT1-MMP 蛋白表达与浸润、转移的关系

Spearman 等级相关分析结果表明,MT1-MMP 蛋白表达水平与肝癌浸润及转移之间均呈正相关关系(表 2)。

表 2 MT1-MMP 蛋白表达与肝癌浸润、转移之间相关分析

Table 2 Relationship between MT1-MMP expression and tumor biological behavior

	n	MT1-MMP protein				r	P
		-	+	++	+++		
Invasion							
Negative	35	21	6	4	4	0.239	0.021
Positive	58	18	20	10	10		
Metastasis							
Negative	68	33	22	10	3	0.336	0.001
Positive	25	6	6	4	9		

3 讨论

1994 年 Sato 等^[2]首次克隆鉴定了膜型基质金属蛋白酶家族的第一个成员 MT1-MMP,随着分子医学的进展,现已知的 MT-MMP 有 6 种,目前认为它们参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解,在肿瘤侵袭、转移过程中发挥极其重要的作用。MT1-MMP 是近年来的研究热点之一,该蛋白酶能激活明胶酶 A(MMP2),促进 MMP2 对基底膜成分如 IV 型胶原和层粘蛋白的降解,但具体激活机制尚未明确。其可能的机制为^[3]:首先 MT1-MMP 识别并酶解切割 MMP2 前肽区域,使 MMP2 转变为中间活性型,然后在纤维蛋白溶酶或自身蛋白水解作用下形成完全活化型。除激活 MMP2 外,最近研究还认为 MT1-MMP 能激活胶原酶 III,且能直接降解多种 ECM 成分,如纤维连接蛋白、层粘蛋白等^[4]。

有学者发现,细胞表面的组织转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase,tTG)作为辅助因子可促使整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 单体结合,MT1-MMP 可以裂解 tTG,导致整合素解聚,从而促进肿瘤细胞的迁移。并且,MT1-MMP 还可通过裂解 CD44 分子产生活性片断,影响肿瘤细胞的黏附及运动能力^[5]。另外,表达 MT1-MMP 的肿瘤细胞生长速度快,血管丰富,这一现象可能与 MT1-MMP 上调 VEGF 的表达有关^[6-8]。Murakami 等^[9]发现在高转移性的肝癌细胞株,MT1-MMP 的表达明显高于低转移性的肝癌细胞株,并且证实肝细胞生长因子能诱导肝癌细胞株表达 MT1-MMP^[10],显著提高其侵袭能力。

本研究通过免疫组化及半定量 RT-PCR 的方法从蛋白及 mRNA 水平观察 MT1-MMP 在大、小肝癌组织中的表达情况,结果表明,MT1-MMP 蛋白在大、小肝癌组织中的表达差异显著,并且其表达水平与肿瘤浸润、转移之间均呈正相关关系。该结果提示大肝癌细胞的侵袭能力较小肝癌强与大肝癌高表达 MT1-MMP 蛋白有关,其机制可能是通过增强肿瘤细胞对 ECM 的降解及肿瘤血管的生成能力,从而促使肿瘤发生浸润和远处转移。但本研究中 MT1-MMP mRNA 水平的差异在大、小肝癌中并无统计学意义,究其原因可能由以下几点:本组 RT-PCR 实验病例数较免疫组化病例数少,从而造成统计结果偏差;调控 MT1-MMP 蛋白异常表达

的关键环节可能是在转录后水平进行。Seiki 等^[11]的研究发现 MT1-MMP 前蛋白肽的 C 末端具有一特定的氨基酸序列(RXKR),若该序列被相关蛋白酶切割,则能诱导 MT1-MMP 活化,提示 MT1-MMP 的调控可能是在转录后水平进行。我们的实验结果印证了上述结论。

综上所述,我们认为 MT1-MMP 蛋白表达增强是大肝癌生物学行为较小肝癌更为恶性的重要影响因素。如果在肝癌瘤体直径达到 3 cm 之前,在转录后水平对 MT1-MMP 进行干扰,阻滞肝癌病程的恶性进展,有可能对肝癌患者的治疗起到积极作用。

参考文献:

- [1] Lohi J, Lehti K, Valtanen H, *et al.* Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene[J]. *Gene*, 2000, 242(1-2):75-86.
- [2] Sato H, Okada Y, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion [J]. *Thromb Haemost*, 1997, 78(1):497-500.
- [3] Theret N, Musso O, L'Helgoualc'A, *et al.* Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP2 activation in injured human livers [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(3):945-54.
- [4] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3):161-74.
- [5] Kajita M, Itoh Y, Chiba T, *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(5): 893-904.
- [6] Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis [J]. *Matrix Biol*, 2003, 22(1):55-61.
- [7] Deryugina EI, Bourdon MA, Jungwirth K, *et al.* Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase [J]. *Int J Cancer*, 2000, 86(1):15-23.
- [8] Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, *et al.* Human hepatocellular carcinoma (HCC) cells require both [alpha]3 [beta]1 integrin and matrix metalloproteinases activity for migration and invasion [J]. *Lab Invest*, 2001, 81(4):613-27.
- [9] Murakami K, Sakukawa R, Ikeda T, *et al.* Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of membrane-type 1 matrix metalloproteinase [J]. *Neoplasia*, 1999, 1(5):424-30.
- [10] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, *et al.* Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1 [J]. *Hepatol Res*, 2003, 27(4):289-301.
- [11] Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion [J]. *Cancer Lett*, 2003, 194(1):1-11.

(编辑 黄小延)

(上接第 668 页 from page 668)

permeability and blood flow [J]. *Stroke*, 1995, 26(12): 2307-12.

- [8] Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, *et al.* Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat [J]. *Brain Res*, 2003, 973(2): 171-8.

- [9] 宿宝贵, 许鹿希. 用水迷宫检测大鼠空间辨别性学习记忆的探讨 [J]. *解剖学研究*, 1999, 21(1): 30-2.

- [10] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, *et al.* Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(21): 7994-8004.

(编辑 张恩健)